



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ :

A61K 7/48

A1

(11) Numéro de publication internationale:

WO 96/21421

(43) Date de publication internationale:

18 juillet 1996 (18.07.96)

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR96/00037

(22) Date de dépôt international: 9 janvier 1996 (09.01.96)

(30) Données relatives à la priorité:

95/00327 9 janvier 1995 (09.01.95) FR

95/00329 9 janvier 1995 (09.01.95) FR

(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): SOCIÉTÉ D'EXPLOITATION FRANÇAISE DES RECHERCHES BIODERMA [FR/FR]; ZAC Pichaury II, Rue Pierre-Berthier, F-13290 Les Milles (FR).

(71)(72) Déposant et inventeur: THOREL, Jean-Noël [FR/FR]; 3, rue de la Rochelle, F-75014 Paris (FR).

(72) Inventeur; et

(75) Inventeur/Déposant (US seulement): GATTO, Hugues [FR/FR]; 15, rue Pasteur, F-73200 Albertville (FR).

(74) Mandataire: CABINET GERMAIN & MAUREAU; Boîte postale 3011, F-69392 Lyon Cédex 03 (FR).

(81) Etats désignés: AL, AM, AT, AU, AZ, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IS, JP, KE, KP, KR, KZ, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, brevet ARIPO (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), brevet eurasien (AZ, BY, KZ, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée

*Avec rapport de recherche internationale.**Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.*

(54) Title: NUTRIENT MEDIUM FOR USE AS A CULTURE MEDIUM FOR EPIDERMAL CELLS, AND USES THEREOF

(54) Titre: MILIEU NUTRITIF UTILISABLE COMME MILIEU DE CULTURE DE CELLULES EPIDERMiques ET APPLICATIONS

(57) Abstract

A complex nutrient medium containing compounds that are biocompatible, biomimetic and bioavailable in the skin, but no biological extract of animal or cellular origin, for preparing a topical composition. Said complex nutrient medium has a suitable composition enabling viable *in vitro* culture of a human epidermal keratinocyte inoculum, with at least one clonal proliferation thereof during the first stage, and without the use of a live nutritive layer. The composition may be used as the active principle, particularly in a cosmetic preparation or a galenic base, and as a carrier capable of potentiating the activity of specific active principles.

(57) Abrégé

Utilisation, pour l'obtention d'une composition à usage topique, d'un milieu nutritif complexe, comprenant des composés à la fois biocompatibles, bio-mimétiques et biodisponibles au niveau cutané, à l'exclusion de tout extrait biologique d'origine animale ou cellulaire, ledit milieu nutritif complexe ayant une composition adaptée pour permettre une culture viable *in vitro* d'un inoculum de kératinocytes épidermiques humains, avec au moins une prolifération clonale de ces derniers au premier passage, sans assise nourricière vivante. La composition de l'invention peut être utilisée à titre de principe actif notamment dans une préparation cosmétique ou une base galénique, ainsi qu'à titre d'excipient susceptible de potentialiser l'action de principes actifs spécifiques.

BEST AVAILABLE COPY

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Arménie	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
AT	Autriche	GE	Géorgie	MX	Mexique
AU	Australie	GN	Guinée	NE	Niger
BB	Barbade	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	HU	Hongrie	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	IT	Italie	PL	Pologne
BJ	Bénin	JP	Japon	PT	Portugal
BR	Brésil	KE	Kenya	RO	Roumanie
BY	Bélarus	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Suède
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SG	Singapour
CH	Suisse	LJ	Liechtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LR	Libéria	SN	Sénégal
CN	Chine	LT	Lituanie	SZ	Swaziland
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	LV	Lettonie	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DK	Danemark	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
EE	Estonie	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	UG	Ouganda
FI	Finlande	MN	Mongolie	US	Etats-Unis d'Amérique
FR	France	MR	Mauritanie	UZ	Ouzbékistan
GA	Gabon			VN	Viet Nam

**Milieu nutritif utilisable comme milieu de culture de
cellules épidermiques et applications**

La présente invention concerne un milieu nutritif complexe, ses applications et plus particulièrement son utilisation pour fabriquer une composition à usage topique, et notamment cosmétique ou médicamenteuse.

La composition obtenue selon l'invention permet de créer un environnement extra-cellulaire parfaitement adapté à l'épiderme, en fournissant en particulier :

- un apport nutritionnel optimisé, aussi bien en vitamines, oligo-éléments, qu'en acides aminés essentiels,
- des facteurs de croissance cellulaire, visant à substituer les interactions cellulaires morphogènes,
- et des caractéristiques de pH et d'osmolarité proches des conditions physiologiques.

De manière générale, conformément à l'invention l'agent nutritionnel consiste en un milieu nutritif complexe, comprenant des composés à la fois biocompatibles, biomimétiques et biodisponibles au niveau cutané, à l'exclusion de tout extrait biologique d'origine animale, tel que sérum de veau foetal, ou d'origine cellulaire.

Le milieu nutritif complexe retenu selon l'invention a une composition adaptée pour permettre à lui seul et en milieu aqueux, une culture in vitro viable d'un inoculum de kératinocytes épidermiques humains avec au moins une prolifération clonale de ces derniers au premier passage, sans assise nourricière vivante telle que les fibroblastes.

Par "biocompatible", on entend la propriété selon laquelle le composé présente une innocuité au niveau cutané.

Par "biomimétique", on entend le fait que le composé est présent à l'état naturel dans la peau.

Par "biodisponible", on entend la propriété selon laquelle le composé est assimilable par les kératinocytes épidermiques humains, aussi bien in vitro qu'in vivo.

Par des essais de routine, l'homme de métier est à même de formuler un milieu nutritif complexe selon l'invention, en procédant en particulier avec ledit milieu à des cultures in vitro de kératinocytes, dont la croissance peut être observée, par exemple au microscope.

A cet égard, les documents suivants ont déjà décrit des milieux adaptés à des cultures in vitro de kératinocytes, dont la viabilité et la croissance peuvent être objectivées par les tests actuellement en vigueur, et être directement appréciées par observation sous microscope :

15 - Boyce ST, Ham RG, Calcium-regulated differentiation of normal human epidermal keratinocytes in defined clonal culture and serum-free serial culture, J. Invest. Dermatol. 1983; 81: 33S-40S

 - Boyce ST, Ham RG, Cultivation, frozen storage, and clonal growth of normal human epidermal keratinocytes in serum-free media, J. Tissue Culture Methods. 1985; 9: 83-93.

En tant que de besoin, le contenu de ces publications est incorporé à la présente description.

25 Le milieu nutritif complexe selon l'invention comprend des acides aminés, une ou plusieurs vitamines, un ou plusieurs facteurs de croissance cellulaire, et un ou plusieurs sels minéraux.

Une composition à usage topique de l'invention comprend une phase biocompatible avec les parties superficielles du corps humain, dans laquelle est distribué de manière homogène au moins ledit milieu nutritif tel que défini ci-dessus.

35 Dans une composition selon la présente invention, la phase biocompatible dans laquelle est distribué l'agent

nutritionnel peut constituer l'excipient, ou l'un des composants de l'excipient de ladite composition.

L'ensemble des composés présents dans le milieu nutritif selon l'invention étant hydrosolubles, deux voies
5 de formulation peuvent être mises en oeuvre pour obtenir une composition à usage topique :

1) Phase continue aqueuse, contenant le milieu nutritif selon l'invention :

- sous forme de gel aqueux, à l'aide d'un polymère
10 hydrosoluble non ionique du type polysaccharide ou éther de cellulose (polymères compatibles avec la forte charge ionique du milieu);

- sous forme de système émulsionné (émulsion d'huile dans l'eau faisant appel à des tensio-actifs
15 résistant aux fortes charges ioniques);

- sous forme de sérum cosmétique.

2) Phase continue huileuse, la phase discontinue contenant le milieu nutritif selon l'invention :

- sous forme émulsionnée, étant entendu que la
20 force ionique de la phase discontinue implique l'instabilité de l'émulsion ; il est cependant possible de formuler des phases lamellaires ou cylindriques présentant une meilleure stabilité, ou encore un système bi-phasique remis extemporanément en émulsion par simple agitation;

25 - par encapsulation :

* dans une capsule rigide, du type polysaccharide, dispersée dans la phase lipidique,

* dans une capsule molle, du type gélatine, dispersée dans la phase discontinue.

30 L'utilisation de liposomes comme vecteur d'encapsulation est envisageable sous forme d'un gel liposomal en phase continue aqueuse.

Une composition selon l'invention peut servir de base cosmétique. Son apport nutritionnel est notablement
35 intéressant pour l'amélioration de la viabilité, le maintien de l'intégrité et l'équilibre des cellules

cutanées superficielles. En particulier elle permet de préserver durablement les qualités intrinsèques primaires de la peau, d'augmenter sa résistance aux agressions et de favoriser, le cas échéant, son retour à un état d'équilibre.

Un autre objet de l'invention est une préparation cosmétique comprenant une base précédemment définie, dans laquelle le milieu nutritif complexe constitue soit un principe actif, soit un excipient en présence d'autres principes actifs qu'il est susceptible de potentialiser.

Le milieu nutritif complexe de l'invention peut aussi être utilisé pour la préparation ou l'obtention d'un médicament.

L'utilisation d'un tel milieu sur une peau fragilisée (peaux irritées, desséchées, peaux sénescences,...), permet de retrouver un état cutané satisfaisant tant en terme de trophicité que d'hydratation des couches superficielles de l'épiderme.

Une composition médicamenteuse comprenant un milieu nutritif complexe selon l'invention peut servir de base galénique, notamment nutritive.

Elle possède en outre des propriétés pharmacologiques qui seront mises en évidence dans les exemples. Selon une application avantageuse d'une composition médicamenteuse de l'invention, elle est destinée au traitement conservateur des greffons après leur prélèvement. Elle se présentera de manière préférentielle sous la forme d'une solution stérile particulièrement adaptée pour le nettoyage et l'entretien des greffons chez les grands brûlés.

En outre une composition telle que précédemment définie présente des propriétés performantes pour prévenir ou traiter des troubles de la cicatrisation tels que escarres, ulcères variqueux, vergetures, chéloïdes, et/ou un retard de la cicatrisation.

De manière plus générale, une composition selon l'invention peut être incorporée dans toute préparation à usage galénique, en tant que principe actif avec éventuellement d'autres principes actifs, mais également
5 comme excipient grâce à sa capacité à potentialiser l'action de principes actifs spécifiques.

Les caractéristiques, applications et avantages de la présente invention sont exposés plus en détails dans les Exemples 1 à 4 et Figures 1 à 4 suivants.

10 L'Exemple 1 donne un exemple de formulation d'une composition de l'invention.

L'Exemple 2 met en évidence les propriétés d'une composition de l'invention par rapport à des milieux connus, à l'appui du dessin annexé dans lequel :

15 Fig. 1 est une vue en coupe d'épidermes humains après 36 heures de culture dans un milieu commercial standard dénommé MCDB 153, commercialisé notamment par IRVINE SCIENTIFIC et GIBCO-BRL,

20 Fig. 2 est une vue en coupe d'épidermes humains après 36 heures de culture dans une solution saline tamponnée (PBS), solution saline équilibrée couramment utilisée en culture cellulaire, et

Fig. 3 est une vue en coupe d'épidermes humains en culture dans le milieu nutritif de l'invention, décrit à
25 l'Exemple 1 à différents temps de culture :

A : au bout de 12 heures

B : au bout de 24 heures

C : au bout de 36 heures

L'Exemple 3 met en évidence l'absence de
30 stimulation de la prolifération de cellules transformées par une composition de l'invention par rapport à une composition standard, à l'appui de la Fig.4 qui représente un diagramme montrant la multiplication de cellules transformées cultivées sur un milieu de l'invention et un
35 milieu standard.

L'Exemple 4 illustre les propriétés pharmacologiques d'une composition de l'invention : a) sur le traitement de greffons ; b) sur la cicatrisation.

5

Exemple 1:

Formulation d'une composition de l'invention

TABLEAU 1

COMPOSANTS	Concentration en mg/l.
Acides aminés	
L-Alanine	9,2
L-Arginine HCL	421,4
L-Asparagine (anhydre)	14,2
Acide L-aspartique	4,0
L-Cystéine HCL.H ₂ O	42,0
Acide L-glutamique	14,8
L-Glutamine	1754,4
Glycine	7,6
L-Histidine HCL.H ₂ O	50,0
L-Isoleucine	6,0
L-Leucine	131,2
L-Lysine HCL	54,0
L-Méthionine	13,5
L-Phénylalanine	10,0
L-Proline	34,6
L-Sérine	126,1
L-Thréonine	24,0
L-Tryptophane	9,3
L-Tyrosine 2 Na 2H ₂ O	11,7
L-Valine	70,3

Vitamines et facteurs de croissance cellulaire

d-Biotine	0,02
Acide folique	0,80
Nicotinamide	0,04
D-Ca Pantothenate	0,30
Pyridoxine HCl	0,06
Riboflavine	0,04
Thiamine HCl	0,30
Vitamine B ₁₂	0,41
i-Inositol	18,0
Putrescine 2 HCl	0,20
Pyruvate de sodium	55,0
Thymidine	0,73
Adénine (HCl)	24,0
Acide DL-lipoïque	0,20

Composants inorganiques

Chlorure de sodium	6800,0
KCl	112,0
Na ₂ HPO ₄	284,0
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,003
Acétate de sodium	300,0 (anhydre)
D-Glucose	1080,0
HEPES (pipérazine)	6600,0
Phosphoryléthanolamine	0,06768
Ethanolamine	0,04684
Sulfate de sodium	3,4
Bicarbonate de sodium	1160,0
FeSO ₄ .7H ₂ O	1,39
MgCl ₂ .6H ₂ O	120,0
CaCl ₂ .2H ₂ O	de 13,0 à 22,05
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,144
(NH ₄) ₆ MO ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	0,00120

$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,142
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,00002
$\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,00011
$\text{NH}_4 \text{VO}_3$	0,00057

Exemple 2:

La cytocompatibilité et les performances du milieu nutritif complexe décrit à l'Exemple 1 ont été testées sur des cultures de kératinocytes humains en monocouche, et sur des épidermes humains reconstitués in vitro.

Le milieu nutritif selon l'Exemple 1 permet la culture de kératinocytes en monocouche dans des conditions optimales de viabilité, durant au moins 36 heures, sans que ne se manifeste le moindre effet cytotoxique.

A l'inverse, une solution de survie classique telle que le PBS (Phosphate Buffered Saline, solution saline équilibrée couramment utilisée en culture cellulaire) s'avère cytotoxique dès 12 heures d'incubation.

Conformément à la Fig 3, Le milieu nutritif selon l'exemple autorise une culture d'épidermes humains normaux reconstitués dans des conditions optimales de viabilité, sans manifestations cytotoxiques même après 36 heures (Fig 3C) de mise en contact. Les cultures présentaient des couches cellulaires basales, spineuses, granuleuses et cornées intactes, orthokératosiques, de stratification régulière et normale.

En comparant la Fig 3C avec la Fig 1, cette dernière illustrant l'utilisation d'un milieu commercial standard (MCDB 153, commercialisé notamment par IRVINE SCIENTIFIC), on voit que les performances du milieu de l'invention sont aussi bonnes.

Par contre, l'utilisation de PBS induit, conformément à Fig 2, l'apparition de kératinocytes en phase terminale de différenciation au niveau des assises basales et spineuses, avec des signes de nécrose plus ou

moins prononcés. On note également un décollement total de l'épiderme, avec destruction complète des différentes assises kératinocytaires.

5 Exemple 3: Effets d'une composition de l'invention sur la croissance de cellules épidermiques transformées.

La composition utilisée pour cette étude est celle décrite à l'Exemple 1 comprenant le milieu dit milieu 1.

10 L'effet de la composition 1 sur la croissance d'une lignée de kératinocytes humains spontanément transformée a été testé durant 4 jours de culture par comparaison avec des cellules cultivées sur un milieu standard (DMEM, Dulbecco Modified Epidermal Medium + sérum de veau foetal).

15 Les cellules sont premièrement ensemencées dans le milieu standard et poussent jusqu'au 2^e jour après ensemencement dans ce milieu. Au 2^e jour, le lot de cellules est partagé en deux, un lot continuant à être cultivé en milieu standard, l'autre en milieu 1.

20 Les résultats sont rassemblés sur la figure 4 dans laquelle la courbe obtenue avec les points —□— correspond à la composition de l'invention, et celle obtenue avec les points --□-- correspond à la composition de milieu standard. Les points ont été doublés et les
25 comptages proviennent de quadruplicate. Les résultats sont corrigés de l'écart standard à la moyenne, SEM. La flèche apparaissant sur le diagramme correspond au partage du lot au second jour de culture.

30 La morphologie des cellules est différente selon le milieu employé. Celle des cellules cultivées en milieu 1 se rapproche davantage de celle obtenue en utilisant un milieu semi-défini pour cellules épithéliales, type KSFM de GIBCO-BRL (cellules aux jonctions plus lâches, aspect moins pavimenteux...).

Il n'est pas noté de différence significative dans la pousse de cette lignée en fonction des différents milieux, jusqu'à confluence (jours 6 à 7, non montré ici).

On conclut que la composition 1 n'a aucun effet
5 stimulant sur la prolifération des kératinocytes transformés.

Exemple 4: Effets d'une composition de l'invention sur la prise de greffes de peaux humaines et la prévention
10 des troubles de cicatrisation.

La composition testée est celle décrite à l'Exemple 1 comprenant le milieu dit milieu 1.

Les effets de la composition 1 sur la prise de greffes de peaux humaines et la prévention des troubles de
15 la cicatrisation ont été étudiés sur un modèle murin (souris athymique dépourvue d'immunité à médiation cellulaire).

Deux types de greffons ont été employés: épidermes de culture et peaux humaines issues de chirurgie
20 plastique. Les greffons ont été irrigués durant 30 jours avec 1 ml de composition 1 (une application par jour) pour les souris du groupe A et 1 ml de solution saline tamponnée (PBS) pour les souris du groupe B (20 animaux par groupe). Des compresses de tulle gras ont été
25 appliquées après chaque irrigation afin d'éviter la dessiccation des greffons.

Une observation clinique des greffes a été réalisée à J-7, J-15 et J-30.

Deux paramètres ont été évalués : la nécrose des
30 épidermes de culture et la cicatrisation.

a) la nécrose des épidermes de culture ("prise de greffes")

La cotation est effectuée de 0 à 3 : 0= aucun signe de nécrose; 1= inflammation légère et altération
35 superficielle du greffon; 2= nécrose partielle; 3= nécrose totale.

Les résultats sont rassemblés dans le Tableau 2.

TABLEAU 2

5 SOURIS DU GROUPE A

(20 greffons au total traités par la composition nutritive)

Cotations	J-7	J-15	J-30
0	9/20	12/20	16/20
1	7/20	4/20	0/20
2	3/20	2/20	2/20
3	1/20	2/20	2/20

10 SOURIS DU GROUPE B

(20 greffons traités par la solution saline tamponée)

Cotations	J-7	J-15	J-30
0	2/20	4/20	7/20
1	8/20	6/20	3/20
2	6/20	5/20	5/20
3	4/20	5/20	5/20

La composition 1 améliore la prise des greffes d'épidermes humains de culture sur souris athymiques par rapport à une solution de survie classique (PBS). Des différences significatives sont notées dès 7 jours de traitement pour une amélioration finale de plus de 50%.

20 b) la cicatrisation (avec les peaux totales greffées)

Une cotation est effectuée de 0 à 3 : 0 = aucun trouble de cicatrisation; 1 = retard de cicatrisation ; 2 = retard avec anomalie de la

12

cicatrisation (bourgeonnement de la cicatrice) ; 3 = cicatrice hypertrophique.

Les résultats sont rassemblés dans le Tableau 3.

5

TABLEAU 3

SOURIS DU GROUPE A

(20 peaux totales greffées et traitées par la composition nutritive)

10

Cotations	J-7	J-15	J-30
0	20/20	16/20	15/20
1	0/20	3/20	2/20
2	0/20	1/20	2/20
3	0/20	0/20	1/20

SOURIS DU GROUPE B

(20 peaux totales greffées et traitées par la solution saline tamponnée)

15

Cotations	J-7	J-15	J-30
0	16/20	10/20	5/20
1	4/20	7/20	8/20
2	0/20	3/20	3/20
3	0/20	0/20	4/20

La composition 1 améliore de façon significative les processus de cicatrisation; cet effet est particulièrement marqué après 30 jours de traitement.

20

REVENDICATIONS

- 1/ Utilisation d'un milieu nutritif complexe, ayant une composition adaptée pour permettre à lui seul et en milieu aqueux, une culture viable in vitro d'un
5 inoculum de kératinocytes épidermiques humains, avec au moins une prolifération clonale de ces derniers au premier passage, sans assise nourricière vivante, pour la fabrication ou l'obtention d'une composition à usage topique.
- 10 2/ Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que les composants du milieu nutritif sont à la fois biocompatibles, bio-mimétiques et biodisponibles au niveau cutané, à l'exclusion de tout
15 extrait biologique d'origine animale ou d'origine cellulaire.
- 3/ Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que le milieu nutritif complexe comprend des acides aminés, au moins une vitamine, au moins un facteur de croissance cellulaire, et au moins un
20 sel minéral.
- 4/ Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que le milieu nutritif complexe a la composition suivante, la concentration des composants étant exprimée en mg/l :

25

Acides aminés

L-Alanine	9,2
L-Arginine HCL	421,4
L-Asparagine (anhydre)	14,2
Acide L-aspartique	4,0
L-Cystéine HCL. H ₂ O	42,0
Acide L-Glutamique	14,8
L-Glutamine	1754,4
Glycine	7,6
L-Histidine HCL. H ₂ O	50,0
L-Isoleucine	6,0

L-Leucine	131,2
L-Lysine HCl	54,0
L-Méthionine	13,5
L-Phénylalanine	10,0
L-Proline	34,6
L-Sérine	126,1
L-Thréonine	24,0
L-Tryptophane	9,3
L-Tyrosine 2 Na 2H ₂ O	11,7
L-Valine	70,3

Vitamines et facteurs de croissance cellulaire

d-Biotine	0,02
Acide folique	0,80
Nicotinamide	0,04
D-Ca Pantothénate	0,30
Pyridoxine HCl	0,06
Riboflavine	0,04
Thiamine HCl	0,30
Vitamine B ₁₂	0,41
i-Inositol	18,0
Putrescine 2 HCl	0,20
Pyruvate de sodium	55,0
Thymidine	0,73
Adénine (HCl)	24,0
Acide DL-lipoïque	0,20

Composants inorganiques

Chlorure de sodium	6800,0
KCl	112,0
Na ₂ HPO ₄	284,0
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,003
Acétate de sodium	300,0 (anhydre)
D-Glucose	1080,0
HEPES (pipérazine)	6600,0
Phosphoryléthanolamine	0,06768

15

Ethanolamine	0,04684
Sulfate de sodium	3,4
Bicarbonate de sodium	1160,0
FeSO ₄ .7H ₂ O	1,39
MgCl ₂ .6H ₂ O	120,0
CaCl ₂ .2H ₂ O	de 13,0 à 22,05
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,144
(NH ₄) ₆ MO ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	0,00120
Na ₂ SiO ₃ .5H ₂ O	0,142
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,00002
SnCl ₂ .2H ₂ O	0,00011
NH ₄ VO ₃	0,00057

5/ Composition à usage topique comprenant une phase biocompatible avec les parties superficielles du corps humain, dans laquelle est distribué de manière
 5 homogène au moins un milieu nutritif tel que défini selon l'une quelconque des revendications 1 à 4.

6/ Composition selon la revendication 5, caractérisée en ce qu'elle se présente sous forme biphasique, avec une phase continue aqueuse contenant le
 10 milieu nutritif complexe, et notamment sous forme de gel aqueux, ou d'émulsion d'huile dans l'eau.

7/ Composition selon la revendication 5, caractérisée en ce qu'elle se présente sous forme biphasique, avec une phase continue huileuse, notamment
 15 sous forme d'émulsion, la phase discontinue contenant le milieu nutritif complexe.

8/ Base cosmétique comprenant une composition selon l'une quelconque des revendications 5 à 7.

9/ Préparation cosmétique comprenant une base
 20 cosmétique selon la revendication 8, caractérisée en ce que le milieu nutritif complexe constitue soit un principe actif, soit un excipient, notamment potentialisant un autre principe actif.

10/ Utilisation d'un milieu nutritif complexe, ayant une composition adaptée pour permettre à lui seul et en milieu aqueux, une culture viable in vitro d'un inoculum de kératinocytes épidermiques humains, avec au moins une prolifération clonale de ces derniers au premier passage, sans assise nourricière vivante, pour la fabrication ou obtention d'un médicament.

11/ Utilisation selon la revendication 10, caractérisée en ce que les composés du milieu nutritif sont à la fois biocompatibles, bio-mimétiques et biodisponibles au niveau cutané, à l'exclusion de tout extrait biologique d'origine animale ou d'origine cellulaire.

12/ Utilisation selon la revendication 10, caractérisée en ce que le milieu nutritif complexe comprend des acides aminés, au moins une vitamine, au moins un facteur de croissance cellulaire, et au moins un sel minéral.

13/ Utilisation selon la revendication 10, caractérisée en ce que le milieu nutritif complexe a la composition suivante, la concentration des composants étant exprimée en mg/l :

Acides aminés

L-Alanine	9,2
L-Arginine HCl	421,4
L-Asparagine (anhydre)	14,2
Acide L-aspartique	4,0
L-Cystéine HCl. H ₂ O	42,0
Acide L-Glutamique	14,8
L-Glutamine	1754,4
Glycine	7,6
L-Histidine HCl.H ₂ O	50,0
L-Isoleucine	6,0
L-Leucine	131,2
L-Lysine HCl	54,0

L-Méthionine	13,5
L-Phénylalanine	10,0
L-Proline	34,6
L-Sérine	126,1
L-Thréonine	24,0
L-Tryptophane	9,3
L-Tyrosine 2 Na 2H ₂ O	11,7
L-Valine	70,3

Vitamines et facteurs de croissance cellulaire

d-Biotine	0,02
Acide folique	0,80
Nicotinamide	0,04
D-Ca Pantothénate	0,30
Pyridoxine HCl	0,06
Riboflavine	0,04
Thiamine HCl	0,30
Vitamine B ₁₂	0,41
i-Inositol	18,0
Putrescine 2 HCl	0,20
Pyruvate de sodium	55,0
Thymidine	0,73
Adénine (HCl)	24,0
Acide DL-lipoïque	0,20

Composants inorganiques

Chlorure de sodium	6800,0
KCl	112,0
Na ₂ HPO ₄	284,0
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,003
Acétate de sodium	300,0 (anhydre)
D-Glucose	1080,0
HEPES (pipérazine)	6600,0
Phosphoryléthanolamine	0,06768
Ethanolamine	0,04684

Sulfate de sodium	3,4
Bicarbonate de sodium	1160,0
FeSO ₄ .7H ₂ O	1,39
MgCl ₂ .6H ₂ O	120,0
CaCl ₂ .2H ₂ O	de 13,0 à 22,05
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,144
(NH ₄) ₆ MO ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	0,00120
Na ₂ SiO ₃ .5H ₂ O	0,142
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,00002
SnCl ₂ .2H ₂ O	0,00011
NH ₄ VO ₃	0,00057

14/ Utilisation selon l'une quelconque des revendications 10 à 13, caractérisée en ce que l'agent nutritionnel constitue l'un des, sinon le principe actif dudit médicament.

15/ Utilisation selon l'une quelconque des revendications 10 à 14 pour obtenir un médicament destiné au traitement conservateur des greffons.

16/ Utilisation selon l'une quelconque des revendications 10 à 14 pour prévenir ou traiter les troubles et/ou retard de la cicatrisation.

17/ Composition médicamenteuse à usage topique comprenant une phase biocompatible avec les parties superficielles du corps humain, dans laquelle est distribué de manière homogène au moins un milieu nutritif tel que défini selon l'une quelconque des revendications 10 à 13.

18/ Composition selon la revendication 17, caractérisée en ce qu'elle se présente sous forme biphasique, avec une phase continue aqueuse contenant le milieu nutritif complexe, et notamment sous forme de gel aqueux, ou d'émulsion d'huile dans l'eau.

19/ Composition selon la revendication 17, caractérisée en ce qu'elle se présente sous forme biphasique, avec une phase continue huileuse, notamment

sous forme d'émulsion, la phase discontinue contenant le milieu nutritif complexe.

20/ Base galénique comprenant une composition selon l'une quelconque des revendications 17 à 19.

5 21/ Base galénique selon la revendication 20, caractérisée en ce qu'elle est destinée au traitement conservateur des greffons.

22/ Base galénique selon la revendication 20, caractérisée en ce qu'elle est destinée à la prévention ou
10 au traitement des troubles et/ou retard de la cicatrisation.

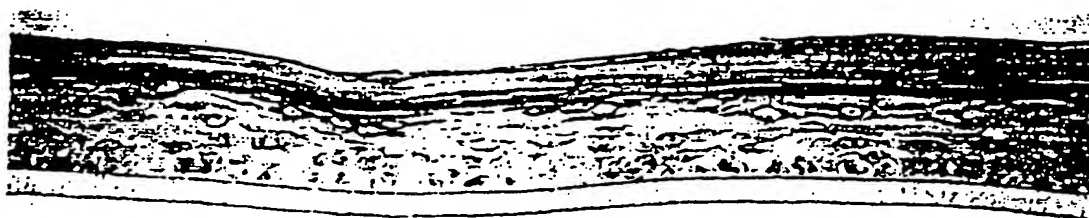
FIG 1



FIG 2



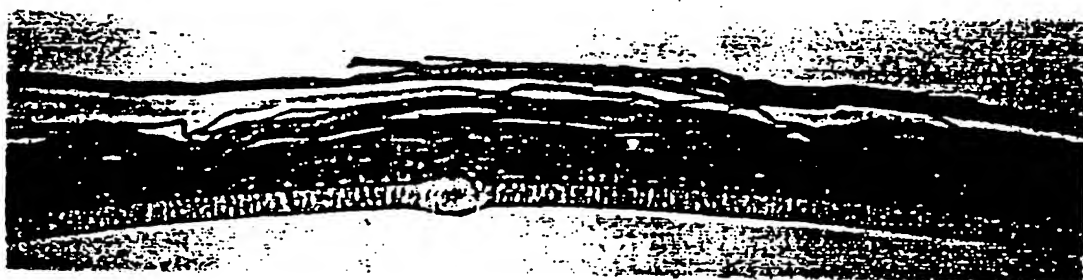
FIG 3



A

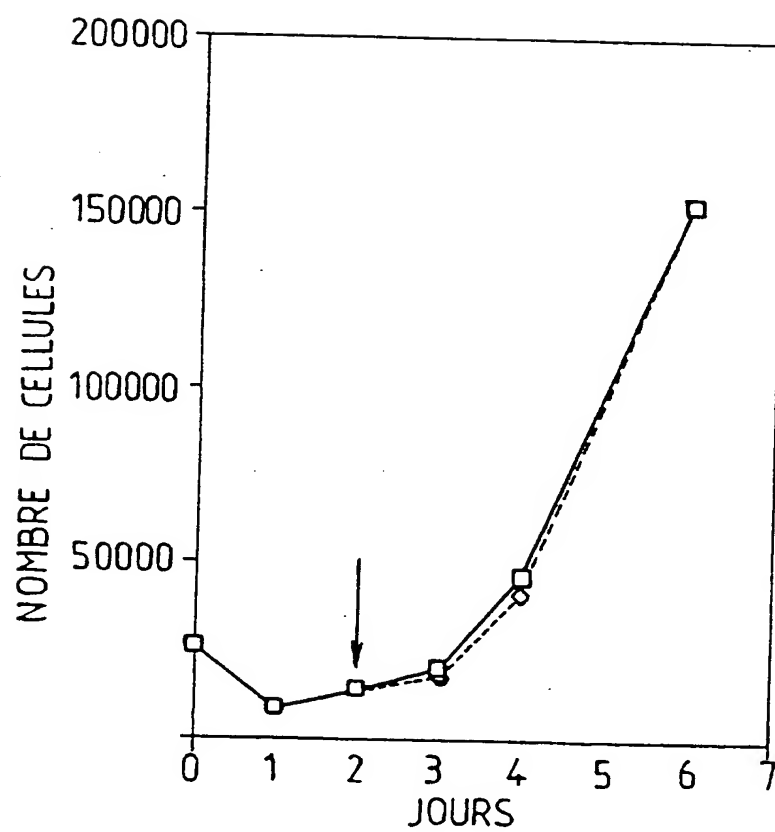


B



C

FIG 4



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PC1/FR 96/00037

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 A61K7/48

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO,A,94 13260 (LMVH RECHERCHE) 23 June 1994	1,5, 8-10,14, 17,20
Y	see the whole document	1-22
Y	FR,A,2 694 692 (J.N. THOREL) 18 February 1994 see the whole document	1-22
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 11, no. 193 (C-430) [2640] , 20 June 1987 & JP,A,62 019511 (KANEBO LTD.), 28 January 1987, see abstract	1-22

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 April 1996

Date of mailing of the international search report

10.05.1996

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Sierra Gonzalez, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PC1/FR 96/00037

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9413260	23-06-94	FR-A- 2699072	17-06-94
		FR-A- 2699080	17-06-94
		EP-A- 0673238	27-09-95
FR-A-2694692	18-02-94	NONE	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem. n° Internationale No
PC./FR 96/00037

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 A61K7/48

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO,A,94 13260 (LMVH RECHERCHE) 23 Juin 1994	1,5, 8-10,14, 17,20
Y	voir le document en entier ---	1-22
Y	FR,A,2 694 692 (J.N. THOREL) 18 Février 1994 voir le document en entier ---	1-22
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 11, no. 193 (C-430) [2640] , 20 Juin 1987 & JP,A,62 019511 (KANEBO LTD.), 28 Janvier 1987, voir abrégé -----	1-22

☐ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *&* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

19 Avril 1996

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

10.05.1996

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Sierra Gonzalez, M

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Dem. 'e Internationale No

PC 1/FR 96/00037

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO-A-9413260	23-06-94	FR-A- 2699072	17-06-94
		FR-A- 2699080	17-06-94
		EP-A- 0673238	27-09-95
FR-A-2694692	18-02-94	AUCUN	

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)